

文章编号: 1000-7423(2006)-05-0385-02

## Sjcb2 DNA 疫苗的构建及其在 HeLa 细胞中的表达

胡永轩<sup>1,2</sup>, 肖建华<sup>1</sup>, 黄家芳<sup>1,3</sup>, 杨秋林<sup>1</sup>

**【摘要】** 构建日本血吸虫组织蛋白酶 B 肽链内切酶基因核酸疫苗, PCR、双酶切和 DNA 序列鉴定后, 运用电穿孔技术将重组体 pcDNA3.1 (+)/Sjcb2 转染 HeLa 细胞, 免疫细胞化学检测其能在 HeLa 细胞浆内表达, 为抗日本血吸虫核酸疫苗的研制打基础。

**【关键词】** 日本血吸虫; 组织蛋白酶 B; DNA 疫苗; 真核表达

中图分类号: R383

文献标识码: B

## Construction of Sjcb2 DNA Vaccine and its Expression in HeLa Cells

HU Yong-xuan<sup>1,2</sup>, XIAO Jian-hua<sup>1</sup>, HUANG Jia-fang<sup>1,3</sup>, YANG Qiu-lin<sup>1</sup>

(1 *Institute of Pathogenic Biology, Nanhua University, Hengyang 421001, China*; 2 *Institute of Microbiology and Immunology, Xiangnan College, Chenzhou 423000, China*; 3 *Aerospace Engineering Company Hospital, Beijing 100800, China*)

**【Abstract】** A recombinant plasmid containing cathepsin B endopeptidase of *Schistosoma japonicum* (Sjcb2) was constructed, indentified by PCR, restrictive enzyme, digestion and DNA sequencing, and expressed into mammalian cells. Immunochemistry examination showed that the Sjcb2 gene can be expressed in the eukaryotic system, providing a basis for the development of schistosome DNA vaccine.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; Cathepsin B Endopeptidase; DNA vaccine; Eukaryotic expression

Supported by the Education Department of Hunan province (No.030A041) and a fund of Xiangnan University (No.06Q004)

WHO把发展血吸虫病疫苗作为控制血吸虫病的主要发展方向<sup>[1]</sup>。核酸疫苗是近年来发现的新型疫苗, 因其具有制备简单、能诱导较强而持久的体液免疫应答和细胞免疫应答等优点, 在问世后的 10 多年中已得到了疫苗学、肿瘤学等领域的广泛重视, 显示了其广泛的应用前景<sup>[2]</sup>。日本血吸虫在其寄生生活中, 须要不断地从宿主摄取营养, 以满足自身生长、发育和生存的需要, 组织蛋白酶 B 肽链内切酶能降解宿主血红蛋白, 被认为是日本血吸虫生活史中的一个重要分子, 本试验探讨其核酸疫苗(pcDNA3.1(+)/Sjcb2)的构建及在真核细胞中的表达情况。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 质粒与菌种 真核表达质粒 pcDNA3.1 (+)、克隆载体 pBCSK+-Sjcb2 及大肠埃希菌 *E.coli* DH5a 均由本室保存; 质粒 pUCm-T 购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.1.2 工具酶与试剂 DNA 聚合酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、X-gal(5-溴-4 氯-3-吡啶-β-硫代半乳糖苷) 和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷

(IPTG) 购自上海生物工程技术服务有限公司, *EcoRI* 和 *XbaI* 购自日本 Takara (大连) 公司; 羊抗兔 IgG-HRP 购自北京华美生物工程公司, 兔抗日本血吸虫多抗由本室制备保存。

1.1.3 细胞 人宫颈癌细胞株购自中国科学院上海细胞研究所。

#### 1.2 方 法

##### 1.2.1 Sjcb2 DNA 疫苗的构建

1.2.1.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中日本血吸虫组织蛋白酶 B 基因全序列 (登录号为 AY226984) 设计 1 对引物<sup>[3]</sup>, 并在引物上下游引入 *EcoRI* 和 *XbaI* 限制性内切酶酶切位点:

F:5'-ATA GAA TTC GCC AGG CGA CAT AAA CGT-3'

*EcoRI*

R:5'-GCA TCT AGA GAT GGC AAT GAT GAA TAA CAG A-3'

*XbaI*

引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.1.2 pUCm-T/Sjcb2 的构建及鉴定 以含有编码全长 Sjcb2 cDNA 的 pBCSK+-Sjcb2 为模板<sup>[4]</sup>, 依设计合成的引物, PCR 扩增 Sjcb2 cDNA 全长序列, 与 pUCm-T 载体连接, 常规法转化受体菌, 在含 X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上筛选, 并利用 PCR 和 *EcoRI*、*XbaI* 双酶切分析及测序分析鉴定阳性克隆。

1.2.1.3 pcDNA3.1(+)/Sjcb2 真核表达重组体的构建及鉴定 少量制备 pUCm-T/Sjcb2 质粒 DNA。用 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切, 将目的片段与经同样的处理 pcDNA3.1(+)载体连接, 转化受体菌, 筛选并鉴定阳性克隆。

**基金项目:** 湖南省教育厅重点资助项目(No.030A041); 湘南学院科研资助(No.06Q004)

**作者单位:** 1 湖南南华大学病原生物学研究所, 衡阳 421001; 2 湖南湘南学院微生物与免疫教研室, 郴州 423000; 3 北京航天总医院, 北京 100800

### 1.2.2 pcDNA3.1 (+) /Sjcb2 在 HeLa 细胞中的表达

1.2.2.1 DNA 疫苗 pcDNA3.1 (+) /Sjcb2 和 pcDNA3.1 (+) 质粒的制备 按质粒纯化试剂盒说明抽提、纯化重组质粒和空质粒, -20 °C 保存备用。

1.2.2.2 HeLa 细胞的培养 将 HeLa 细胞培养在含 10% 小牛血清 (FCS)、100 U/ml 青霉素、0.1 μg/ml 链霉素的达尔伯氏改良培养基 (DMEM) 中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

1.2.2.3 质粒转染 HeLa 细胞 0.25% 胰酶消化处于对数生长期的 HeLa 细胞, 室温 30×g 离心 10 min, 收集细胞, 用磷酸盐缓冲液洗涤 1 次, 以不含 FCS 的双抗达尔伯氏改良细胞培养基 (DMEM) 重悬细胞, 使细胞浓度在 1×10<sup>6</sup>/ml。稀释质粒 DNA, 使其浓度在 10~20 μg/ml。取 10 μl 质粒和 100 μl 细胞混合, 并转入电击杯; 电击完毕后把细胞移入六孔板 (内置载玻片), 加 3~5 ml 不含 FCS 的双抗 DMEM, 8 h 后换成含 FCS 的双抗 DMEM 继续培养, 36~48 h 后鉴定 Sjcb2 的表达情况。

1.2.2.4 免疫细胞化学法检测 Sjcb2 基因在 HeLa 细胞中的表达 将转染的细胞用乙醇固定 10 min, PBS 洗涤 1 次; 加 50 μl 1:500 稀释的一抗 (兔抗日本血吸虫血清), 4 °C 孵育过夜。加 HRP 酶标记的羊抗兔 IgG (二抗), 30 °C 湿盒内放置 30 min; PBS 洗涤, 3×5 min 后用 3, 3'-二氨基联苯 (DAB) 显色; 苏木素复染, 显微镜观察表达情况。

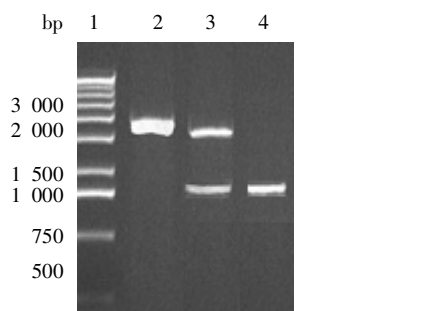
## 2 结果

2.1 PCR 扩增 Sjcb2 琼脂糖凝胶电泳测定显示, 从 pBC SK+ /Sjcb2 扩增片段大小约为 1 047 bp, 与预期大小一致。

2.2 pUCm-T/Sjcb2 的鉴定 经 PCR 和 *EcoRI*、*XbaI* 双酶切分析, 获得大小为 1 047 bp 的目的片段, 再经自动测序仪测序分析, 证明亚克隆插入子序列与模板中的相应序列完全相同。

2.3 pcDNA3.1 (+) /Sjcb2 真核表达重组体的构建及鉴定 成功构建了 pcDNA3.1 (+) /Sjcb2 重组体 (图 1)。

2.4 pcDNA3.1 (+) /Sjcb2 在 HeLa 细胞中的表达 免疫细胞化学法检测显示, 重组质粒组细胞浆有阳性表达颗粒, 而空质粒组则无 (图 2)。

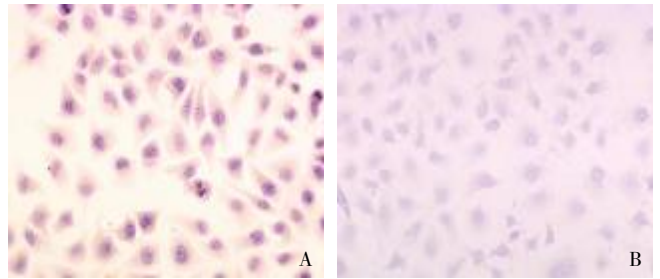


1: Lambda DNA *Hind* III+*Eco* R I 标志物, 2: pcDNA3.1(+)/Sjcb2 重组质粒, 3: pcDNA3.1(+)/Sjcb2 经 *Eco* RI 和 *Xba* I 双酶切, 4: PCR 产物。

图 1 pcDNA3.1(+)/Sjcb2 双酶切及 PCR 鉴定

## 3 讨论

血吸虫寄生于宿主静脉系统, 以摄取宿主红细胞血红蛋白 (Hb) 作为主要营养来源。血吸虫通过自身的血红蛋白酶将宿主红细胞中的 Hb 降解加以利用。研究表明, 血红蛋白酶包括



A: pcDNA3.1/Sjcb2 转染 HeLa 细胞, B: pcDNA3.1 转染 HeLa 细胞。

图 2 免疫细胞化学检测 Sjcb2 在 HeLa 细胞中的表达 (10×20)

组织蛋白酶、门冬氨酸蛋白酶、门冬酰胺蛋白酶及其某些肽类, 属于半胱氨酸蛋白酶的组织蛋白酶被认为是降解宿主 Hb 的主要酶类, 其主要包括组织蛋白酶 B, H 和 L。日本血吸虫的组织蛋白酶 B 占优势, 定位于血吸虫肠道, 相对分子质量 (*Mr*) 为 31 000, 血吸虫感染人和动物均可引发强烈的免疫应答。血吸虫感染者血清及免疫小鼠抗 Sjcb2 抗体水平与血吸虫感染度和排卵量相关<sup>[5-7]</sup>, 说明 Sjcb2 分子在日本血吸虫病特异性诊断及抗血吸虫感染疫苗的研究中均具有重要价值。

本研究应用真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 和哺乳动物细胞 HeLa 细胞来表达日本血吸虫组织蛋白酶 B, pcDNA3.1 (+) 表达系统能够在哺乳动物细胞中瞬时高表达。将重组质粒 Sjcb2/pcDNA3.1 (+) 利用电穿孔技术转染 HeLa 细胞, 通过免疫细胞化学方法, 证明 HeLa 细胞能够表达含 Sjcb2 的融合蛋白, 表明该重组质粒能够在真核细胞中表达特异性蛋白, 为日本血吸虫致病机制的研究和抗日本血吸虫核酸疫苗的研制打下基础。

## 参 考 文 献

- [1] Chitsulo L, Engels D, Montessoro A, et al. The global status of schistosomiasis and its control[J]. *Acta Trop*, 2000, 77: 41-51.
- [2] Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247: 1465-1470.
- [3] Hu YX, Xiao JH, Zeng Q, et al. Acquisition and structural and functional analysis of cathepsin B endopeptidase gene of *Schistosoma japonicum*[J]. *Chin J Zoon*, 2004, 20: 790-793. (in Chinese) (胡永轩, 肖建华, 曾桥, 等. 日本血吸虫组织蛋白酶 B 肽链内切酶基因的获得及结构与功能分析[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20: 790-793.)
- [4] Yang S, Xiao JH, Zeng Q, et al. Construction and identification of a cDNA expression library from adult worm of *Schistosoma japonicum*[J]. *Pract J Prevent Med*, 2002, 9(4): 28-30. (in Chinese) (杨胜, 肖建华, 曾桥, 等. 日本血吸虫 cDNA 表达文库的构建和分析[J]. *实用预防医学杂志*, 2002, 9(4): 28-30.)
- [5] Yi XY, Zeng XZ, Zeng XF, et al. Studies on anti-fecundity induced by cathepsin B DNA vaccine of *Schistosoma japonicum*[J]. *Chin J Zoon*, 2000, 16(1): 45-47. (in Chinese) (易新元, 曾宪忠, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫组织蛋白酶 B DNA 疫苗抗生殖免疫的研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 45-47.)
- [6] Wu ZD, Yu XB. Isolation and identification of expressed *Schistosoma japonicum* genes from a directional cDNA library by EST strategy[J]. *Chin J Zoon*, 2000, 16(1): 3-5. (in Chinese) (吴忠道, 余新炳. 日本血吸虫 (中国大陆株) 表达基因的分离和 EST 序列测定[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 3-5.)
- [7] Franco GR, Valadao AF, Azevedo V. The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art[J]. *Int J Parasitol*, 2000, 30: 453-463. (收稿日期: 2005-10-18 编辑: 伯韦)